

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

НІКОЛЬСЬКА КАТЕРИНА ІГОРІВНА

УДК 612.35.646 : 612.017 : 615.361.



**СТИМУЛЯЦІЯ РЕГЕНЕРАЦІЇ ІМУННОЇ СИСТЕМИ ОПРОМІНЕНИХ
МИШЕЙ ТРАНСПЛАНТАЦІЄЮ ГЕМОПОЕТИЧНИХ СТОВБУРОВИХ
КЛІТИН І ПРОГЕНІТОРІВ, ПРЕІНКУБОВАНИХ З МУЛЬТИПОТЕНТНИМИ
СТРОМАЛЬНИМИ КЛІТИНАМИ ТИМУСА**

14.03.08 – імунологія та алергологія
(Медичні науки)

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

Харків – 2020

Дисертацією є кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Робота виконана у відділі клітинних та тканинних технологій ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини Національної академії медичних наук України».

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор,
академік НАМН України, член-кор. НАН України
Бутенко Генадій Михайлович,
ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини
НАМН України»,
директор, завідувач відділу клітинних та тканинних
технологій.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор,
академік НАН України
Гольцев Анатолій Миколайович,
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної
академії наук України,
директор;

доктор медичних наук, професор
Курченко Андрій Ігорович,
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця
МОЗ України,
завідувач кафедри клінічної імунології та алергології з
секцією медичної генетики.

Захист відбудеться «22» вересня 2020 року о 12.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.051.33 Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 6, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, медичний факультет, ауд. 580.

З дисертацією можна ознайомитись у Центральній науковій бібліотеці Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.

Автореферат розісланий «18» серпня 2020 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
доктор медичних наук



Т.І. Лядова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Стимуляція регенерації імунної системи є однією із найважливіших проблем теоретичної і практичної медицини. Відомо, що імунна система - одна з найбільш чутливих до дії шкідливих чинників навколишнього середовища, іонізуючого випромінювання і стресів різного характеру. Неминучі кількісні і якісні ушкодження імунної системи виникають і при первинних імунodefіцитах, багатьох розповсюджених інфекціях, аутоімунних, алергічних і онкологічних захворюваннях. При летальному опроміненні відновлення імунної системи практично не відбувається, а формується кістковомозковий синдром, обумовлений лізисом і припиненням утворення гемопоетичних клітин, формуванням імунodefіциту з розвитком опортуністичної інфекції, джерелом якої є уражений кишківник [Чернишов А.В., 2004; Кирик В.М., 2009].

Природно, що основним патогенетично обґрунтованим і єдиним методом лікування за цих обставин є відновлення клітин, структури і функцій імунної системи, а виключним підходом для цього є трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) та їх прогеніторів, з яких формуються всі імунні клітини [Бутенко Г.М., 2008] під впливом контактної взаємодії з мультипотентними стромальними клітинами (МСК).

Розвиток ГСК у кістковому мозку значною мірою обумовлений мікрооточенням, одним із головних компонентів якого є МСК та їх похідні: SNO-клітини (spindle-shaped N-cadherin⁺CD45⁻ osteoblastic cells), Lepr⁺-клітини, CAR-клітини (CXCR12 abundant reticular cells), фібробласти, остеобласти, адипозні та деякі інші клітини і міжклітинний матрикс [Becker N.B. et al., 2018; Garcia M. et al., 2018; Nguyen T.S. et al., 2018].

У кістковому мозку МСК і ГСК знаходяться у тісному контакті, що забезпечує, разом з іншими факторами, перебування ГСК у дормантному стані, можливість самооновлення і вихід їх у відповідний час у диференціювання. Сформулювалось уявлення про так звані кістково-мозкові «ніші» ГСК, де останні перебувають у сприятливих умовах мікрооточення.

На відміну від МСК кісткового мозку роль МСК тимуса – ще одного провідного органу імунітету – у функціонуванні ГСК і прогеніторів мало вивчена. Між тим, є важливі дані про участь мезенхімальних клітин уже в ембріональному органогенезі тимуса [Suniara R.K. et al., 2000], формуванні дорослого тимуса [Foster K. et al., 2008], утворенні ними тимусних «ніш», через які проходять і підпадають під позитивну та негативну селекцію тимоцити ранніх стадій диференціювання [Savion S. et al., 1989]. МСК тимуса також беруть участь і в контролі міграції тимоцитів [Sawada M. et al., 1992]. Також МСК тимуса суттєво відрізняються від інших за походженням: мезодермальним і ектодермальним (нейральний гребінець) [Yamauchi Y. et al., 1999] і, за даними аналізу транскриптів, за експресією регуляторних генів [Patenaude J., Perreault C., 2016].

Але невідомо, чи має значення контактна взаємодія МСК тимуса з ГСК і прогеніторами для реалізації регенеративної активності останніх.

Враховуючи вищезазначене, актуальність вивчення ролі контактної взаємодії ГСК і МСК тимуса у регенерації і функціонуванні імунної системи, сформульована мета і поставлені задачі дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано в лабораторії імунології відділу клітинних та тканинних технологій ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України» відповідно до НДР № 01070008763 «Вивчити особливості направленого диференціювання стовбурових клітин та клітин-попередників в нейрональні, ендотеліальні клітини та остеобласти/остеокласти з метою їх подальшого застосування для трансплантації» (здобувач – виконавець), № 0110U002200 «Вивчити деякі механізми взаємодії мультипотентних стромальних і гемопоетичних стовбурових клітин та залежні від їх властивостей процеси диференціювання лімфоцитів» (здобувач – виконавець), № 0113U000102 «Вивчити механізми імунокорекції при спільному застосуванні гемопоетичних стовбурових і мультипотентних стромальних клітин» (здобувач – виконавець).

Мета роботи: підвищення ефективності регенерації імунної системи опромінених мишей трансплантацією МСК тимуса і преінкубованих з ними клітин кісткового мозку та фетальної печінки.

Задачі дослідження.

1. Адаптувати способи отримання і культивування ГСК і прогеніторів фетальної печінки мишей. Вивчити вплив кріоконсервування на життєздатність отриманих КФП і активність їх контактної взаємодії з МСК тимуса.
2. Оптимізувати методики одержання та культивування МСК тимуса в різних умовах *in vitro* та визначити їх життєздатність і здатність до лінійного диференціювання після кріоконсервування.
3. Визначити наявність мембранної спорідненості у МСК і деяких клітин гемопоетичного походження за їх контактною взаємодією *in vitro*.
4. Вивчити вплив сингенної трансплантації МСК тимуса на виживаність і тривалість життя загиблих летально опромінених мишей і активність клітин у регенерації імунної системи опромінених реципієнтів.
5. Дослідити вплив сингенної трансплантації преінкубованих з МСК тимуса ГСК і прогеніторів кісткового мозку на виживаність і середню тривалість життя загиблих летально опромінених мишей.
6. Вивчити вплив трансплантації нормальних і преінкубованих з МСК тимуса ГСК і прогеніторів фетальної печінки на виживаність мишей і середню тривалість життя загиблих тварин.
7. Дослідити можливість стимуляції у опромінених мишей клітинної регенерації трансплантацією преінкубованих з МСК тимуса ГСК і прогеніторів кісткового мозку та фетальної печінки.
8. Визначити можливість стимуляції імунобіологічної активності преінкубованих з МСК тимуса ГСК і прогеніторів кісткового мозку та фетальної печінки при їх трансплантації летально опроміненим мишам.

Об'єкт дослідження. Імунологічна, регенеративна і радіозахисна активність МСК тимуса, особливості регенеративної, імунологічної і радіозахисної активності

ГСК і прогеніторів фетальної печінки і кісткового мозку, преінкубованих з МСК тимуса *in vitro*.

Предмет дослідження. Препарати ГСК і прогеніторів кісткового мозку дорослих мишей, фетальної печінки мишей і МСК тимуса мишей лінії СВА, виживаність і тривалість життя опромінених мишей, активність природного і адаптивного імунітету летально опромінених мишей – реципієнтів ГСК і прогеніторів після їх інкубації *in vitro* з МСК тимуса.

Методи дослідження. Імунологічні, цитологічні, культуральні, кріобіологічні методи і статистичний аналіз.

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше показано, що МСК тимуса і гемопоетичні клітини мають виражену мембранну спорідненість, яка надає їм можливість контактної взаємодії, що *in vitro* проявляється формуванням фібробласто-лімфоцитарних асоціацій у вигляді розеток, коли до стромальної клітини міцно прикріплюється кілька гемопоетичних клітин. Уперше встановлено, що трансплантація МСК тимуса стимулює регенерацію імунної системи, підвищуючи виживаність летально опромінених мишей в результаті відновлення кількості клітин в тимусі і кістковому мозку з підсиленням здатності останніх до утворення фібробластних колоній і активації природного і адаптивного імунітету. Отримані дані свідчать про можливість використання МСК тимуса для регенерації імунної системи у подальшому для корекції імунodefіцитів. Уперше виявлено, що в результаті преінкубації *in vitro* з МСК тимуса суттєво зростає радіозахисна, регенеративна і імунологічна активність ГСК і прогеніторів фетальної печінки і кісткового мозку, що при їх трансплантації проявляється підвищенням виживаності летально опромінених тварин з відновленням клітинності тимуса, зростанням кількості лімфоцитів у периферичній крові і вираженою стимуляцією природного і адаптивного імунітету. Встановлене підвищення регенеративної, імунологічної і радіозахисної активності ГСК і прогеніторів кісткового мозку та фетальної печінки в результаті попередньої контактної взаємодії з МСК тимуса, виявлене при трансплантації клітин летально опроміненим мишам, висвітлює фундаментальне значення кооперації ГСК з МСК тимуса у формуванні властивостей гемопоетичних клітин. Подовження виживаності летально опромінених мишей і суттєва стимуляція імунорегенеративної активності, виявлені при трансплантації сингенних МСК тимуса, є новими даними, які розширюють уявлення про механізм імунобіологічної дії цих клітин. Методика контактної взаємодії МСК–ГСК може бути покладена в основу способу підвищення ефективності трансплантатів ГСК.

Практичне значення отриманих результатів. Запропонована модель для вивчення контактної взаємодії МСК і гемопоетичних клітин *in vitro* на основі їх мембранної спорідненості, яка проявляється утворенням фібробласто-лімфоцитарних розеток (ФЛР), сприяє розвитку наукового напрямку вивчення клітинної кооперації у функціонуванні імунної системи. Виявлений феномен і методику його отримання доречно використовувати в лабораторній практиці і клінічній роботі. У практиці результати дослідження можуть бути використані в лабораторній роботі з різними типами гемопоетичних клітин і МСК в культурі *in vitro*. Отримані дані можуть бути основою для розробки способів підвищення

ефективності клінічної трансплантації ГСК і прогеніторів шляхом попередньої інкубації цих клітин з МСК тимуса. Результати наголошують і на реальну можливість застосування МСК тимуса у подальшому для проведення імунотерапії при гемоімунодефіцитах. Практичне значення мають дані про збереження належної активності вивчених кріоконсервованих клітин, що свідчить про можливість збереження досліджених МСК і ГСК у кріобанках для подальшої трансплантації.

Публікації. Матеріали дисертації опубліковано в 25 наукових працях, серед яких 7 статей у наукових фахових виданнях (у т.ч. з них 2 статті у виданнях, що мають імпакт-фактор і входять до наукометричної бази даних Scopus), 4 статті у інших наукових виданнях, 2 патенти на корисну модель, 12 тез доповідей на фахових вітчизняних і міжнародних наукових конференціях.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною науковою працею, в якій висвітлені власні дослідження та розробки автора, що дозволили вирішити поставлені завдання. Дисертант оволодів сучасними високотехнологічними імунологічними, цитологічними, культуральними та кріобіологічними методами. Робота містить теоретичні положення та висновки, які сформульовані автором особисто. Використані в дисертаційній роботі положення чи гіпотези інших авторів мають відповідні посилання і використані лише для підкріплення ідей дисертанта. Планування дисертаційної роботи та обговорення основних її положень проведено спільно з науковим керівником академіком НАМН України, професором Г.М. Бутенком.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи оприлюднені на IX Українській науково-практичній конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації (Київ, 2007), X Українській науково-практичній конференції з актуальних питань клінічної лабораторної імунології, алергології та імунології (Київ, 2008), VII Російській конференції імунологів Уралу «Актуальні питання фундаментальної і клінічної імунології та алергології» (Архангельськ, 2009), конференції «Нове у діагностиці, лікуванні і профілактиці імуно- та алергопатологій» (Львів, 2009), VIII конференції імунологів Уралу (Сиктивкар, 2010), Українській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні теорія та практика клінічної імунології та алергології» (Київ, 2010), VI з'їзді з радіаційних досліджень (Москва, 2010), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні питання клінічної та лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації» (Київ, 2011), XIII Українській науково-практичній конференції з актуальних питань клінічної та лабораторної імунології, алергології і імунореабілітації (Київ, 2012), 7th Annual Congress of the German Society for Stem Cell Research associated with Fraunhofer Life Science Symposium 2012 «Stem Cells and Clinical Applications» (Leipzig, 2012), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми регенеративної медицини» (Київ, 2012), I Євразійському конгресі «Трансплантація стовбурових клітин» (Мінськ, 2013), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Трансплантація – сьогодення, минуле та майбутнє» (Київ, 2014), міжнародній науково-практичній конференції «Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині» (Київ, 2017).

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 6 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та додатків. Обсяг загального тексту дисертації складає 221 сторінку (8,9 д.а), з них основного тексту – 148 сторінок (6,1 д.а). Робота ілюстрована 11 таблицями, 18 рисунками та 7 фотографіями. Список використаних джерел містить 359 найменувань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження. В експериментах було використано 519 мишей лінії СВА масою 18–20 г 2–3-місячного віку розплідника віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Е. Кавецького НАН України. Утримання мишей та робота з ними здійснювались у відповідності до міжнародних прийнятих правил проведення робіт з експериментальними тваринами. Всі роботи з експериментальними тваринами проводили з дотриманням вимог статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 р.) та «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986), а також з дотриманням усіх принципів біоетики та норм біологічної безпеки.

Тимус для одержання МСК і кістковий мозок для одержання клітин кісткового мозку забирали у мишей 4-6-тижневого віку. Відмиті центрифугуванням клітини фетальної печінки (КФП) і клітини кісткового мозку (ККМ) ресуспендували в середовищі для кріоконсервування. Кріоконсервування проводили за методикою, що була розроблена в Інституті проблем кріобіології та кріомедицини НАН України [Грищенко В.И. и др., 1988] на програмному заморожувачі KRYO-516 (Planer, Англія) у кріопробірках (Nunc, США) по 1,8 мл. Розморожування клітин проводили безпосередньо перед застосуванням. Від кріопротектора і ембріональної телячої сироватки клітини відмивали центрифугуванням при 250 g протягом 5 хвилин.

МСК тимуса виділяли із експлантатів органу. Клітини були адгезивними, мали фібробластну морфологію і утворювали фібробластні колонії. З метою додаткового ідентифікування МСК вивчали відому здатність цих клітин до диференціювання по остеогенному та адипогенному напрямкам у спеціальних середовищах, оцінюючи ефективність процесу за екстинцією барвників відповідно алізаринового червоного або масляного червоного О.

Мишей опромінювали за допомогою установки «Тератрон» з радіонуклідним джерелом ^{60}Co . Доза опромінення становила 9,0 Гр. Визначали відносну масу тимуса і селезінки та клітинність органів, розраховували за кількістю клітин на 1 мг тканини. Визначення колонієутворюючих одиниць фібробластів (КУО-Ф) проводили протягом 14-добового вивчення посіяних на чашку Петрі клітин. Лейкоцитарну формулу в мазках крові, пофарбованих азур-еозином, досліджували загальноприйнятим в гематології методом. Фагоцитарну активність перитонеальних макрофагів визначали на проточному цитофлуориметрі за кількістю клітин, які захопили мікроорганізми, пофарбовані флуоресцеїна ізотіюціанатом (ФІТЦ). Бактерицидну активність перитонеальних макрофагів мишей досліджували у тесті відновлення нітросинього тетразолію (НСТ) [Coligan J.E. et al., 2003]. Визначення цитотоксичної активності природних кілерів та реакцію бласттрансформації

лімфоцитів (РБТЛ), індуковану фітогемаглютиніном (ФГА), здійснювали МТТ-методом [Mossman T, 1983]. Вміст α/β - і γ -інтерферонів досліджували в супернатантах культур спленоцитів за здатністю інтерферону пригнічувати цитопатогенну дію вірусу везикулярного стоматиту (ВВС) [Stewart W.E., 1979]. Індукцію синтезу α/β -інтерферону здійснювали вірусом хвороби Ньюкасла (ВХН), а для індукції γ -інтерферону додавали конконавалін А (Кон А) (Sigma, США). Активність фактору некрозу пухлин α (ФНПа) визначали за цитотоксичною дією супернатантів культур нормальних або стимульованих ліпополісахаридом (ЛПС) спленоцитів на чутливі до ФНПа клітини L 929 [Huang M. et al, 2015]. Інтенсивність реакції гіперчутливості сповільненого типу (ГСТ) визначали за величиною інфільтративно-запальної реакції у місці повторного введення сенсibilізованим мишам еритроцитів барана. Кількість антитілоутворюючих клітин вивчали методом локального гемолізу в гелі. Визначення титру гемаглютининів та гемолізинів проводили класичним методом. Отримані результати оброблені методами варіаційної статистики за допомогою програм Excell (MS Office XP) та Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.). Для визначення відмінностей між досліджуваними групами використовували непараметричний критерій Мана-Уїтні (U) і точний критерій Фішера. Дані представлені у вигляді медіани (Median) з нижнім і верхнім квартилями (25% – 75%). При інтерпретації результатів критичною величиною рівня значущості вважали $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення.

ГСК і прогенітори кісткового мозку дорослих мишей легко вимиваються із діафізів стегнових кісток, а ті, що містяться у фетальній печінці мишей 14 діб гестації, можуть бути отримані шляхом механічної або м'якої ферментативної обробки тканини. Життєздатність отриманих КФП та їх здатність до формування ФЛР не порушувалася в результаті кріоконсервування, культивування з МСК тимуса і кондиційним середовищем культивованих клітин.

МСК тимуса мишей ефективно, з утворенням фібробластних колоній, нарощувалися із експлантатів тимуса на скляній і пластиковій поверхні. На поверхні целофанових пластинок спостерігався зливний ріст МСК тимуса з обох сторін мембрани без колонієутворення. Проявляючи мультипотентність, МСК тимуса володіли здатністю до остео- і адипогенного диференціювання у спеціальних середовищах.

Вперше встановлено, що МСК тимуса і гемопоетичні клітини мають виражену мембранну спорідненість, яка забезпечує їм можливість контактної взаємодії *in vitro*, що проявлялося формуванням клітинних поєднань з центрально розташованою МСК і кількома приєднаними до неї гемопоетичними клітинами – фібробласто-лімфоцитарних розеток (ФЛР) (рис. 1). Найбільшою спорідненістю до МСК тимуса володіли тимоцити (рис. 2).

З урахуванням викладеного можна було припустити, що контакт МСК з ГСК зможе підсилити імунобіологічну активність гемопоетичних клітин, і на цій основі – радіозахисну.

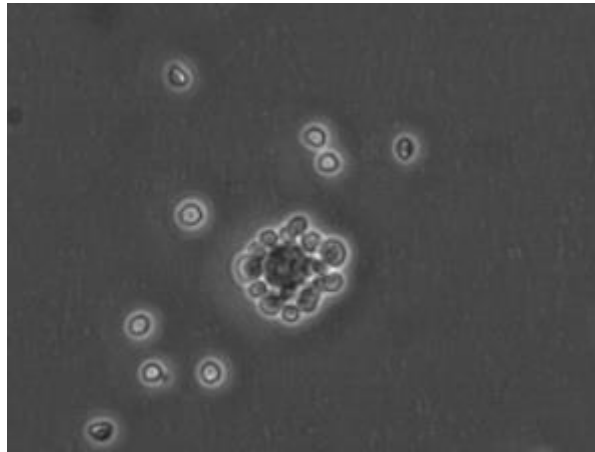


Рис. 1. Фібробластолімфоцитарні розетки, що утворюють МСК тимуса та тимоцити мишей СВА. Збільшення $\times 320$. Фазовий контраст.

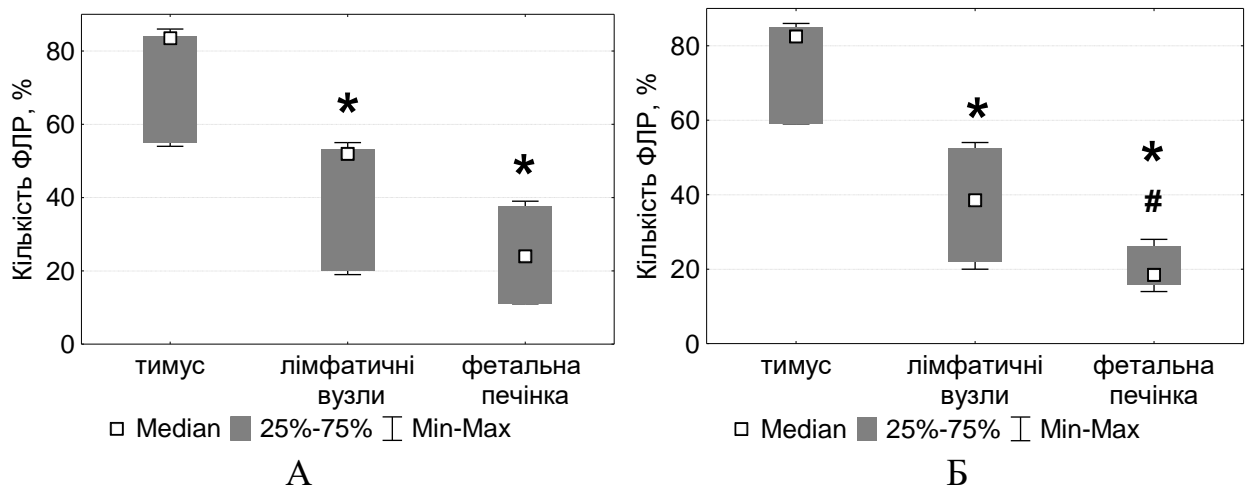


Рис. 2. Кількість ФЛР, що утворені нативними (А) і кріоконсервованими (Б) МСК тимуса з клітинами тимуса, лімфатичних вузлів та фетальної печінки мишей. * – $p < 0,05$ порівняно з клітинами тимуса; # – $p < 0,05$ порівняно з клітинами лімфатичних вузлів.

Вивчали радіозахисні властивості таких кріоконсервованих препаратів ГСК і прогеніторів: клітин кісткового мозку (ККМ) та клітин фетальної печінки (КФП) мишей, а також цих же клітин, преінкубованих *in vitro* з МСК тимуса мишей (іККМ, іКФП), що були представлені в культурах численними фібробластними колоніями. Також досліджували радіозахисну активність самих МСК тимуса мишей, отриманих із культур з численними фібробластними колоніями, та, як контроль на дію клітин, використовували кондиційне середовище з сумісної культури сингенних КФП мишей та МСК тимуса. Культуру МСК тимуса отримували на поверхні 6-лункових планшетів із експлантатів фрагментів тимуса. На 12-ту добу культивування, коли утворювалися добре помітні численні колонії фібробластних клітин, із лунок видаляли середовище і додавали 5×10^6 розморожених ККМ або КФП в 2 мл свіжого середовища RPMI 1640 з 10% ембріональної телячої сироватки. Через 20 годин сумісного культивування збирали суспензії ГСК і прогеніторів.

Отримані ГСК і прогенітори різних клітинних препаратів в кількості $0,5 \times 10^6$ і в 0,1 мл середовища RPMI з 10 % сироватки мишей вводили в ретроорбітальний синус опроміненим напередодні (за 24 години) мишам лінії СВА. За даними літератури це мінімальна кількість КKM, яка може сприяти виживаності летально опромінених мишей [Ghosh S. et al., 2017]. Самі МСК вводили в кількості 5×10^4 клітин на одну мишу. За тваринами спостерігали протягом 16 тижнів, фіксуючи дату загибелі кожної миші.

Опромінення призводило до поступової загибелі всіх контрольних мишей до 14 тижня (рис. 3,А). Введення кондиційного середовища (КС) співкультури МСК і КФП не впливало на виживаність тварин. Трансплантація сингенних КKM мишам сприяла підвищенню виживаності тільки в ранні терміни після опромінення і тільки на 3 тижень – суттєво. Далі кількість тварин, які вижили, поступово зменшувалася так, що на 15 тижень гинули всі миші (рис. 3,Б).

Динаміка виживаності тварин після введення іКKM відрізнялася від такої у мишей, що отримували нормальні КKM. З 7 тижня кількість тварин, що вижили, у цій групі переставала зменшуватись, показник виходив на плато і залишався таким до кінця спостереження (16 тижнів). З 14 тижня виживаність мишей у цій групі була достовірно вища, ніж у контролі. Це свідчить про те, що сумісна інкубація МСК з ГСК і прогеніторами супроводжується підтримкою життєдіяльності останніх, можливо, впливом МСК на довгочасно репопулюючі ГСК (ДР-ГСК).

Динаміка виживаності мишей в результаті трансплантації КФП суттєво відрізнялася від тієї, що була в експерименті з КKM, тим, що КФП значно більше підвищували виживаність мишей, причому і на ранніх, і на пізніх термінах спостереження (рис. 3,В), що свідчило про наявність в препаратах КФП певної кількості ГСК з прогеніторами, що здатні проявляти активність тривалий час.

В результаті трансплантації летально опроміненим мишам іКФП динаміка виживаності проявлялася по іншому. Вона була значно вищою досить тривалий час у ранньому періоді, хоча і наприкінці дослідження виживаність у цій групі була суттєво більша, ніж у контролі. Можна припустити, що позитивний ефект на початку експерименту пов'язаний зі стимуляцією при індукції КФП МСК тимуса реакцій природного імунітету і КР-ГСК фетальної печінки.

Середня тривалість життя (СТЖ) загинувших значно підвищувалася тільки у групі тварин, які отримували іКФП, що є наслідком вираженого зниження летальності на ранніх термінах розвитку кістковомозкового синдрому (рис.4).

Окремо заслуговує на увагу той факт, що трансплантація сингенних МСК сприяла тенденції до підвищення показників виживаності майже у всі терміни спостереження (рис. 3,Г), з 14 тижня – достовірно. Це дещо несподіваний результат, тому що МСК не диференціюються в гемопоетичні клітини, а сталі уявлення про лікування радіаційного кістковомозкового синдрому полягають в необхідності трансплантації ГСК і прогеніторів, із яких можуть розвинутих клітини імунної системи.

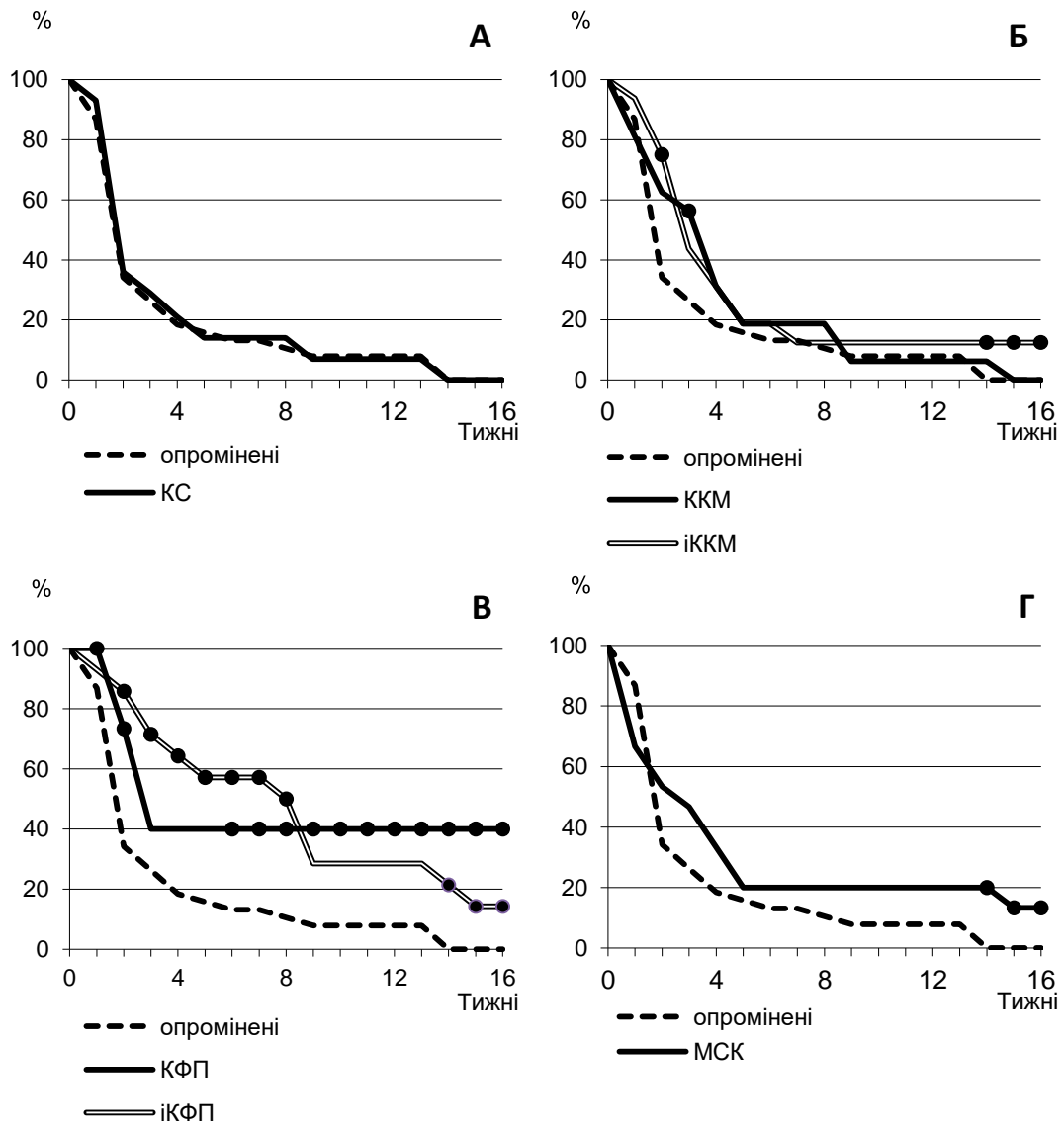


Рис. 3. Динаміка виживаності летально опромінених мишей, захищених кондиційним середовищем (А), нормальними та преінкубованими з МСК тимуса ГСК і прогеніторами кісткового мозку (Б), фетальної печінки (В), МСК тимуса (Г).

● (на лінії) – $p < 0.05$ по відношенню до «опромінених».

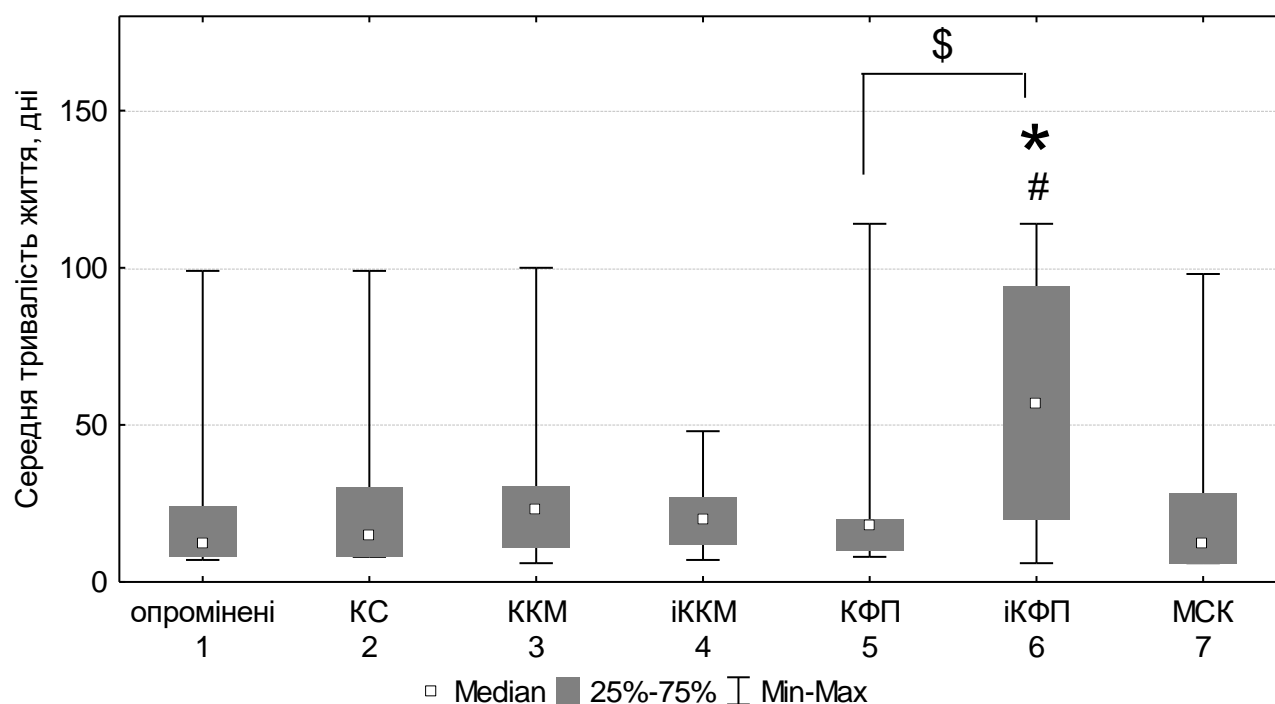


Рис. 4. Середня тривалість життя загиблих летально опромінених мишей, що отримували різні препарати ГСК і прогеніторів. * – $p < 0,05$ по відношенню до опромінених мишей, # – $p < 0,05$ по відношенню до опромінених мишей, що отримували КС, \$ – $p < 0,05$ між групами.

Отримані дані показали, що у порівнянні з нормальними ККМ і КФП індукція цих клітин МСК сприяє підвищенню радіозахисної активності ККМ у пізньому після опромінення періоді, а радіозахисна активність преінкубованих КФП зростає більше у ранньому періоді. Відповідно ефект дії іКФП виділявся і значним подовженням СТЖ загиблих мишей (у 2,4 рази).

Таким чином, встановлено, що контактна взаємодія з МСК тимуса стимулює радіозахисну активність ГСК і прогеніторів, які містяться і в ККМ, і в КФП.

У наступному розділі роботи досліджували регенеративні та імунобіологічні властивості преінкубованих з МСК клітинних трансплантатів.

Отримані клітини (по $0,5 \times 10^6$ нормальних або преінкубованих ККМ і КФП, або 5×10^4 МСК) в об'ємі 0,2 мл вводили в хвостову вену летально опроміненим напередодні (за 24 години) мишам лінії СВА. У кожній дослідній групі було по 30 мишей. За тваринами спостерігали протягом 30 діб, фіксуючи дату загибелі кожної миші. На 25-й день імунізували всіх тварин внутрішньочеревним введенням 1×10^8 еритроцитів барана (ЕБ). Через 4 дні проводили повторну імунізацію (для розвитку реакції ГСТ) введенням такої ж кількості еритроцитів барана в подушечку задньої лапи. Ще через добу (30-й день після опромінення) оцінювали виживаність тварин і визначали показники імунної системи.

Виживаність мишей до 30 дня в групах, які отримували клітинні препарати, достовірно вища була тільки у мишей, що отримували препарати КФП, або КФП, преінкубовані з МСК тимуса (відповідно 38 % і 53 %).

У опромінених мишей суттєво знижувалася маса тіла. Ін'єкція преінкубованих з МСК тимуса КФП нормалізувала масу тіла, що, мабуть, свідчить про ефективну нейтралізацію інтоксикаційних впливів на організм в цілому саме преінкубованими КФП, скоріш за все, завдяки гальмуванню інфекційного процесу.

В результаті опромінення маса тимуса (рис. 5,А) відносна маса тимуса (рис. 5,Б), кількість тимоцитів (рис. 5,В) і клітинність тимуса (рис. 5,Г) драматично зменшувалися. Введення як нормальних ККМ, так і іККМ, а також іКФП призводило до значного відновлення тимуса. Причому взаємодія з МСК значно помітніше впливала на КФП, ніж на ККМ тому що під дією іКФП всі показники достовірно підвищувалися у порівнянні з показниками мишей, що отримували нормальні КФП.

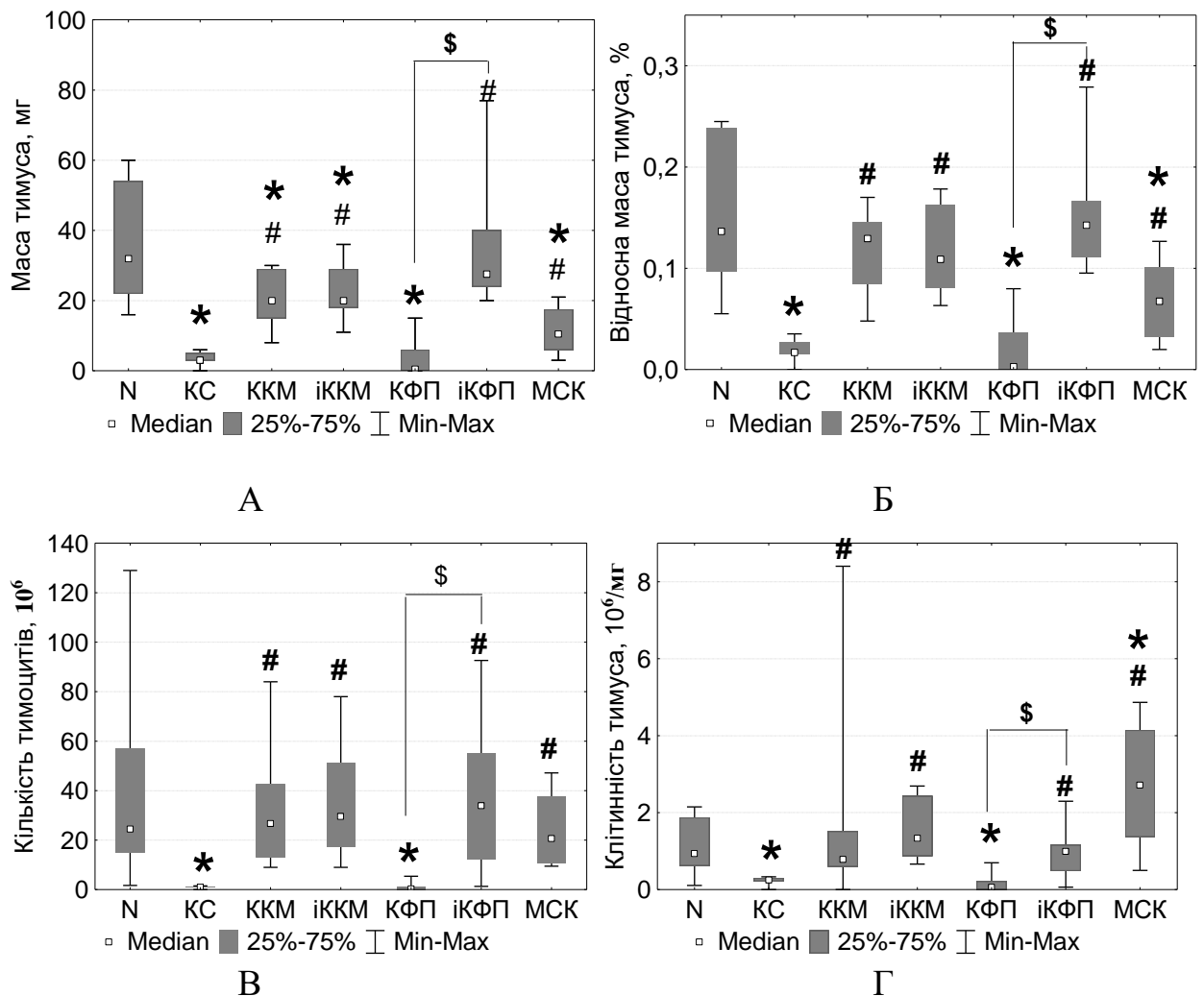


Рис. 5. Маса тимуса (А), відносна маса тимуса (Б), кількість тимоцитів (В), клітинність тимуса (Г) опромінених мишей СВА, що отримували різні клітинні препарати. * – $p < 0,05$ порівняно з групою нормальних мишей; # – $p < 0,05$ порівняно з групою опромінених мишей, що отримували КС; \$ – $p < 0,05$ порівняння між групами.

Особливо треба відзначити, що всі показники тимуса були суттєво більшими і у мишей, що отримували тільки самі МСК, що свідчить про регенеративну дію МСК тимуса відносно цього органу при опроміненні.

Маса селезінки у опромінених мишей на 30 добу була суттєво зменшеною. В результаті трансплантації гемопоетичних клітин можна було побачити ефективну нормалізацію селезінкових показників.

Клітинність кісткового мозку у опромінених мишей значно зменшувалася, а трансплантація всіх клітинних препаратів ГСК і прогеніторів, а також самих МСК тимуса сприяла її відновленню (рис. 6,А). Кількість КУО-Ф у кістковому мозку у опромінених мишей також значно зменшувалася (рис. 6,Б), а у мишей, що отримували різні препарати ГСК і прогеніторів та МСК тимуса, їх чисельність суттєво підвищувалася так, що вже статистично не відрізнялася від показника у нормальних мишей. Таким чином, трансплантація всіх клітинних препаратів значно сприяла відновленню і клітинності кісткового мозку, і однієї із найважливіших функцій МСК – клоногенної.

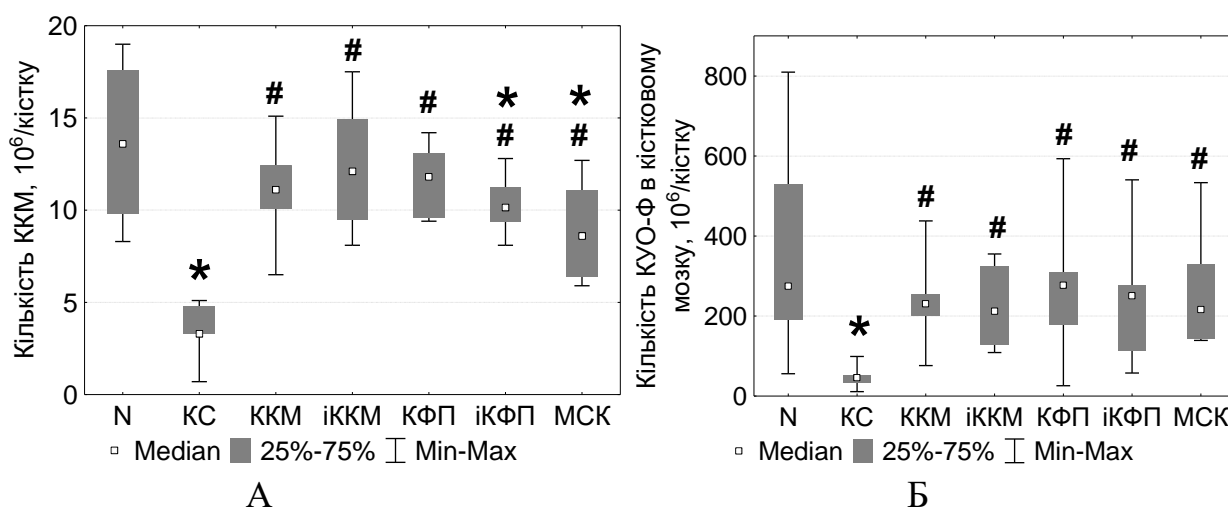


Рис. 6. Кількість клітин (А) та кількість КУО-Ф (Б) в кістковому мозку опромінених мишей СВА, що отримували різні клітинні препарати. * – $p < 0,05$ порівняно з групою нормальних мишей; # – $p < 0,05$ порівняно з групою опромінених мишей, що отримували КС.

Кількість лейкоцитів (дані представлені медіаною з нижнім і верхнім кuartілями) у опромінених мишей суттєво зменшувалася $(1,19(1,16;1,21) \times 10^6/\text{мл}$ проти $6,58(5,30;7,12) \times 10^6/\text{мл}$ у нормі; $p < 0.01$), як і вміст нейтрофілів і лімфоцитів. Кількість лейкоцитів у опромінених мишей зростала після введення іКФП $(1,34(1,29;1,38) \times 10^6/\text{мл}$; $p < 0.001$), а зворотній ефект давало введення іККМ $(1,08(1,03;1,09) \times 10^6/\text{мл}$; $p < 0.001$). Абсолютна кількість нейтрофілів достовірно знижувалася також після введення іККМ $(0,66(0,61;1,09) \times 10^6/\text{мл}$ проти $0,87(0,82;0,91) \times 10^6/\text{мл}$ у опромінених; $p < 0.05$). А от кількість лімфоцитів суттєво збільшувалася у мишей, що отримували преінкубовані ГСК і прогенітори ККМ $(0,35(0,33;0,38) \times 10^6/\text{мл}$ проти $0,26(0,24;0,27) \times 10^6/\text{мл}$ у опромінених; $p < 0.01$) і іКФП $(0,48(0,42;0,50) \times 10^6/\text{мл}$; $p < 0.01$). Таким чином, кількість лейкоцитів, лімфоцитів і нейтрофілів змінювалася в залежності від субпопуляції введених клітин.

Важливі результати отримані при вивченні природного і адаптивного імунітету. В цілому поглинальна і бактерицидна активність фагоцитозу незначно ушкоджувалася опроміненням, а ГСК і прогенітори за цих умов мало її змінювали.

Бактерицидна активність перитонеальних макрофагів при опроміненні суттєво підвищувалася, а трансплантація клітин мало на неї впливала.

Природна цитотоксичність спленоцитів опромінених мишей значно знижувалася (рис. 7), а трансплантація всіх досліджених клітинних препаратів сприяла суттєвому її збільшенню. Необхідно також зазначити, що КФП, які були преінкубовані з МСК тимуса, проявляли більш суттєвий вплив, ніж неіндуковані клітини. Треба зазначити стимулюючу дію трансплантованих МСК на природну цитотоксичність спленоцитів)

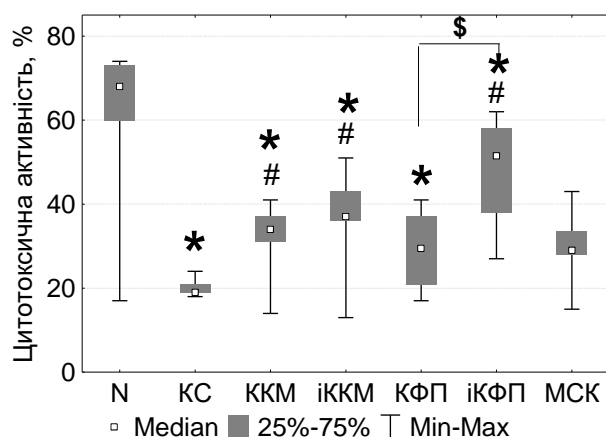


Рис. 7. Природна цитотоксична активність спленоцитів опромінених мишей СВА, що отримували різні клітинні препарати. * – $p < 0,05$ порівняно з групою нормальних мишей; # – $p < 0,05$ порівняно з групою опромінених мишей, що отримували КС; \$ – $p < 0,05$ порівняння між групами.

Індекс РБТЛ, яка здійснювалася клітинами лімфатичних вузлів опромінених мишей зменшувався в усіх досліджених групах (рис. 8). Реакція суттєво підсилювалася в результаті трансплантації індукованих ККМ, нормальних і індукованих КФП. Статистично достовірна різниця спостерігалася також між групами мишей, що отримували нормальні та індуковані ККМ на користь останніх. Введення МСК не впливало на РБТЛ, що, мабуть, відображає відомі дані про антипроліферативну активність МСК.

Спленоцити летально опромінених мишей *in vitro* продукували значно меншу кількість вірусіндукованого α/β - (рис. 9,А) і КонА-індукованого γ -інтерферону (рис. 9,Б). Суттєве зниження продукції вказаних типів інтерферонів спостерігалось і в культурах спленоцитів тварин, які одержували нормальні ККМ і КФП. Навпаки, введення мишам обох препаратів ГСК і прогеніторів, преінкубованих з МСК тимуса, сприяло значному відновленню здатності спленоцитів до синтезу α/β - і γ -інтерферонів.

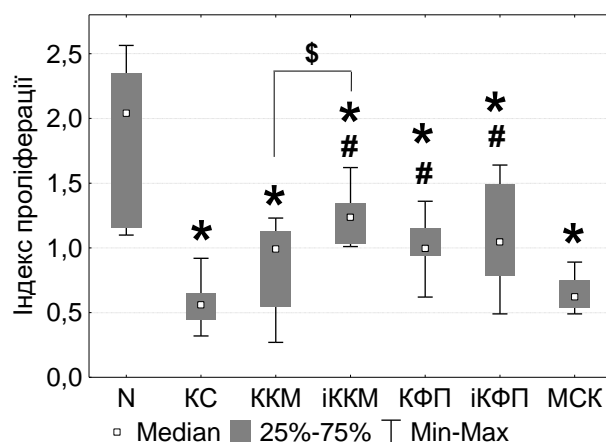


Рис. 8. Проліферативна активність клітин лімфатичних вузлів опромінених мишей СВА, що отримували різні клітинні препарати. * – $p < 0,05$ порівняно з групою нормальних мишей; # – $p < 0,05$ порівняно з групою опромінених мишей, що отримували КС; \$ – $p < 0,05$ порівняння між групами.

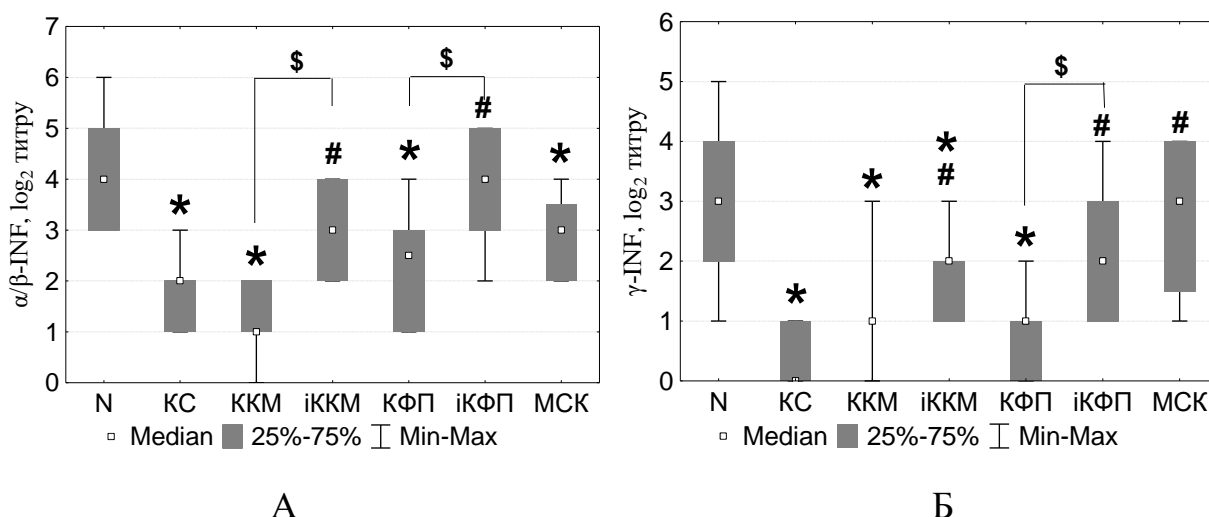


Рис. 9. Кількість α/β - (А) і γ -інтерферону (Б) в кондиційному середовищі спленоцитів опромінених мишей СВА, що отримували різні клітинні препарати. * – $p < 0,05$ порівняно з групою нормальних мишей; # – $p < 0,05$ порівняно з групою опромінених мишей, що отримували КС; \$ – $p < 0,05$ порівняння між групами.

ФНПа в культурі спленоцитів нормальних мишей визначався у слідових кількостях. Навпаки, цитокін у помітній кількості продукувався клітинами опромінених тварин. Причому він виявлявся приблизно в однаково меншій кількості майже незалежно від властивостей введених ГСК і прогеніторів.

Інтенсивність реакції ГСТ у опромінених мишей значно знижувалася. Також реакція ГСТ була значно зниженою у тварин, що отримували нормальні ККМ, КФП, iКФП. Тільки під дією iKKM і МСК показник реакції ГСТ суттєво підвищувався так, що ефект цих клітин достовірно не відрізнявся від норми.

Дослідження гуморального імунітету показало, що у опромінених мишей формування антитілоутворюючих клітини (АУК) у відповідь на імунізацію еритроцитами барана значно пригнічувалося (рис.10), що відповідає високій

чутливості В-лімфоцитів до опромінення. Їх кількість суттєво збільшувалася тільки в групах мишей, що отримували преінкубовані з МСК ГСК і прогенітори, як кісткового мозку, так і фетальної печінки.

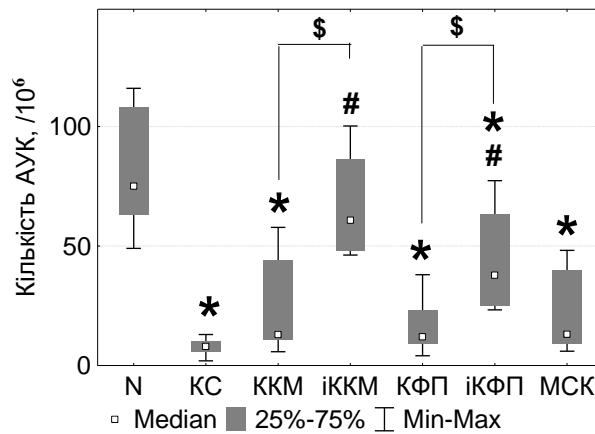


Рис. 10. Кількість АУК/10⁶ спленоцитів опромінених мишей СВА, що отримували різні клітинні препарати. * – $p < 0,05$ порівняно з групою нормальних мишей; # – $p < 0,05$ порівняно з групою опромінених мишей, що отримували КС; \$ – $p < 0,05$ порівняння між групами.

Аналогічна динаміка по групах спостерігалася і при визначенні гемаглютининів і гемолізінів. Результати свідчать про значну стимулюючу роль у процесі формування гуморальної імунної відповіді ГСК і прогеніторів, преінкубованих з МСК тимуса.

Рівень гемолізінів і гемаглютининів суттєво зростає також у тварин, що отримували МСК тимуса.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішено актуальне наукове завдання – експериментально обґрунтована можливість підвищення імунобіологічної, регенеративної і радіозахисної активності трансплантатів ГСК і прогеніторів кісткового мозку та фетальної печінки внаслідок їх попередньої контактної взаємодії з МСК тимуса. Також встановлено, що виражену активність у зазначених напрямках мають і самі МСК тимуса. Отримані дані обумовлюють нові підходи для розробки більш ефективних клітинних трансплантатів на основі ГСК, їх прогеніторів і МСК тимуса, а також способів їх використання у клініці.

1. ГСК і прогенітори, що містяться у фетальній печінці мишей 14 діб гестації можуть бути отримані шляхом механічної або м'якої ферментативної обробки. Життєздатність отриманих КФП і їх здатність до контактної взаємодії з МСК тимуса не порушується в результаті кріоконсервування, культивування з МСК тимуса і кондиційним середовищем МСК тимуса.
2. МСК тимуса мишей ефективно, з утворенням фібробластних колоній, нарощуються із експлантатів тимуса на скляній і пластиковій поверхні культуральних посудин. На поверхні целофанових пластинок спостерігається

зливний ріст МСК тимуса з обох сторін мембрани без колонієутворення. Проявляючи мультипотентність, кріоконсервовані МСК тимуса диференціюються за остео- і адипогенному напрямками у спеціальних середовищах. Клітини зберігають життєздатність після кріоконсервування.

3. Вперше встановлено, що МСК тимуса і гемопоетичні клітини мають виражену мембранну спорідненість, яка забезпечує їм можливість контактної взаємодії *in vitro*, що проявляється формуванням клітинних поєднань з центрально розташованою МСК і кількома приєднаними до неї гемопоетичними клітинами – фібробласто-лімфоцитарних розеток (ФЛР). Найбільшу спорідненість до МСК тимуса мають тимоцити (кількість утворених ФЛР – 84%) і, суттєво меншу, клітини лімфатичних вузлів (кількість утворених ФЛР – 52%) і КФП (кількість утворених ФЛР – 24%), що відображає наявність найвищої мембранної спорідненості до МСК тимуса у незрілих Т-клітин.
4. Вперше показано, що трансплантовані летально опроміненим мишам МСК тимуса суттєво підвищують виживаність тварин (на 13 %) і регенеративні процеси в імунній системі: значно зростає абсолютна (в 3,5 рази) і відносна (в 4 рази) маса тимуса, кількість тимоцитів (в 21 раз) і клітинність тимуса (в 10,8 рази), кісткового мозку (в 2,6 рази), здатність клітин кісткового мозку до утворення фібробластних колоній (в 4,7 рази), стимулюється реакція ГСТ, природна цитотоксичність (в 1,5 рази), утворення γ -інтерферону (в 7,5 рази), та значно зростає вміст гемолізину і гемаглютиніну у сироватці крові.
5. Трансплантація опроміненим мишам нормальних і преінкубованих з МСК тимуса ККМ сприяє тимчасовому підвищенню виживаності (на 30 %) на короткий термін раннього після опромінення періоду. Тільки преінкубовані з МСК тимуса ККМ суттєво підвищують виживаність тварин (на 13%) і наприкінці досліду.
6. Нормальні КФП суттєво (на 27–40 %) підвищують виживаність в основному у пізньому після опромінення періоді. Навпаки, в результаті трансплантації преінкубованих з МСК тимуса КФП виживаність значно підвищується (на 39–52 %), головним чином протягом раннього періоду. Зазначена динаміка виживаності узгоджується зі значним підвищенням середньої тривалості життя загинув тварин (в 4,7 рази) виключно у групі реципієнтів преінкубованих КФП.
7. Вперше встановлено, що в результаті введення преінкубованих з МСК тимуса КФП значно більше, ніж у мишей, які отримували нормальні КФП, підсилюється регенерація тимуса. Відносно тварин, які отримували нормальні клітини, у мишей, що отримували преінкубовані КФП, суттєво зростає кількість лейкоцитів (на 16 %) і лімфоцитів (на 54 %) у периферичній крові. Після введення преінкубованих ККМ вміст лімфоцитів також зростає на 20 %, але кількість лейкоцитів і нейтрофілів суттєво знижується (відповідно на 16 % і 28 %) проти рівня тварин, які отримували нормальні ККМ, що свідчить про відмінності у дії преінкубованих ККМ і КФП на лімфоїдні і мієлоїдні клітини.
8. Вперше показано, що в результаті трансплантації летально опроміненим мишам преінкубованих ККМ і КФП у порівнянні із веденням нормальних клітин суттєво підвищується: рівень гемолізину (відповідно до типу клітин в 16 і 2,5 рази), гемаглютиніну (в 23 і 15 разів), утворення АУК в селезінці (в 4,7 і 3,1 рази),

здатність спленоцитів до синтезу α/β -інтерферону (в 3 і 1,6 рази). Проліферативна активність Т-лімфоцитів у реципієнтів преінкубованих ККМ зростає на 25 %, а в результаті введення преінкубованих КФП в 2 рази стимулюється синтез γ -інтерферону і в 1,7 рази природна цитотоксичність. Отримані дані в цілому свідчать про виражене зростання імунобіологічної і регенеративної активності ГСК і прогеніторів ККМ і КФП внаслідок їх преінкубації з МСК тимуса.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Всі проведені дослідження виконані в рамках фундаментальних НДР. Тим не менше, завдяки отриманим даним можна запропонувати практичні рекомендації.

За отриманими результатами розроблено два патенти на корисну модель стосовно підвищення ефективності регенерації імунної системи завдяки трансплантації ГСК, попередньо проінкубованих з МСК тимуса. Цей принцип може бути покладений в основу нового біотехнологічного підходу для отримання трансплантатів ГСК з більш високою імунорегенеративною і радіозахисною активністю. Для корекції імунodefіцитів може бути рекомендовано також застосування МСК. Для довгострокового збереження і накопичення клітинного матеріалу в кріобанках можна рекомендувати кріоконсервування преінкубованих ГСК, що, як встановлено у роботі, не впливає на життєздатність і здатність клітин до контактної взаємодії.

У лабораторній практиці рекомендується використання нових підходів, які застосовані в роботі для дослідження міжклітинної контактної взаємодії.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці у наукових фахових виданнях України:

1. Никольский И.С., Никольская Е.И. Гемопозитические стволовые клетки в лечении сахарного диабета. *Імунологія та алергологія*. 2006. № 3. С.19-22 (*Особистий внесок здобувача: участь в обговоренні та аналізі літературних даних, їх систематизуванні, написанні статті*).
2. Коляденко В.Г., Никольская Е.И. Гемопозитические стволовые клетки и атопический дерматит. *Український журнал дерматології, венерології, косметології*. 2007. № 2. С.5-7 (*Особистий внесок здобувача: участь в обговоренні та аналізі літературних даних, їх систематизуванні, написанні статті*).
3. Nikolskaya K. I., Butenko G. M. Structural-functional organisation of the bone marrow hematopoietic stem cells niches. *Cell and Organ Transplantology*. 2016. Vol. 4, No 1. P. 101-117 (*Особистий внесок здобувача: участь в обговоренні та аналізі літературних даних, їх систематизуванні, написанні статті*).
4. Nikolska K. I. Peculiarities of culture and in vitro contact interaction of cryopreserved thymic multipotent stromal cells and hemopoietic cells. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2018. Vol. 28, No 1. P. 5–13 (Видання входить до міжнародної наукометричної бази **Scopus**).
5. Nikolska K. I. The effects of the transplantation of thymus-derived multipotent stromal cells on the immune system and survival of lethally irradiated mice. *Cell and Organ*

Transplantology. 2018. Vol. 6, No 2. P. 158-163.

6. Нікольська К.І., Бутенко Г.М. Корекція кістковомозкового синдрому у опромінених мишей трансплантацією гемопоетичних стовбурових клітин. *Фізіологічний журнал*. 2019. Т.65, № 1. С.3-14. (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, проведення експериментів, статистична обробка результатів, участь в обговоренні та інтерпретації результатів, написання статті*).
7. Nikolska K.I. Impact of transplantation of cryopreserved and preincubated with thymic multipotent stromal cells of hemopoietic stem cells on lethally irradiated mice survival. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2019.Vol. 29, No 2. P. 115–124 (Видання входить до міжнародної наукометричної бази **Scopus**).

Наукові праці апробаційного характеру (тези доповідей на наукових конференціях) за темою дисертації:

8. Никольский И.С., Никольская В.В., Федорчук А.Г., Никольская Е.И., Марущенко Ю.Л. Радиозащитное действие криоконсервированных клеток эмбриональной печени в сингенной и ксеногенной комбинациях // Матеріали ІХ Української науково-практичної конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації (Київ, Україна, 25-26 квітня 2007 р.). *Імунологія та алергологія*. 2007. № 3. С.97–98 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез*).
9. Нікольська В.В., Нікольська К.І. Колонієутворення стромальними клітинами тимусу // Матеріали Х Української науково-практичної конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації (Київ, Україна, 22-23 квітня 2008 р.). *Імунологія та алергологія*. 2008. № 2. С.140 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез*).
10. Никольский И.С., Никольская В.В., Федорчук А.Г., Тарануха Л.И., Галицкая С.Н., Никольская Е.И., Зубов Д.А., Лисица Н.А., Семенова Я.-М.А. Влияние преинкубированных с мультипотентными стромальными клетками тимуса сингенных клеток эмбриональной печени на иммунную систему летально облученных мышей // Матеріали ХІ Української науково-практичної конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації (Київ, Україна, 2009 р.). *Імунологія та алергологія*. 2009. № 2-3. С.145 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез*).
11. Никольский И.С., Никольская В.В., Зубов Д.А., Тарануха Л.И., Галицкая С.Н., Никольская Е.И., Лисица Н.А., Семенова Я.-М.А., Федорчук А.Г. Регенерация иммунной системы облученных животных при трансплантации сингенных клеток эмбриональной печени, стимулированных контактом с мультипотентными стромальными клетками тимуса // Сучасні теорія та практика клінічної імунології та алергології: матеріали ХІІ Української науково-практичної конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації (Київ, Україна, 2010 р.). *Імунологія та*

- алергологія. 2010. № 1. С.163 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез*).
- 12.Никольский И. С., Никольская В. В., Тарануха Л. И., Галицкая С. Н., Никольская Е. И., Зубов Д. А., Лисица Н. А., Семенова Я.-М.А., Федорчук А. Г., Сорокин Г. К. Повышение эффективности сингенных клеток эмбриональной печени в регенерации иммунной системы летально облученных мышей в результате контактного взаимодействия этих клеток и мультипотентных стромальных клеток тимуса // Материалы VI Съезда по радиационным исследованиям (Москва, Россия, 25–28 октября 2010 г.). Москва, 2010. Т. 1. С. 94 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез*).
 - 13.Никольская Е.И. Мембранное взаимодействие ex vivo мультипотентных стромальных и гемопоэтических клеток // Сучасні питання клінічної та лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю (Київ, Україна, 12–13 квітня 2011 р.). *Імунологія та алергологія*. 2011. № 4. С.100-101.
 - 14.Никольский И.С, Никольская В.В., Савинова В.О., Никольская Е.И., Тарануха Л.И., Семенова Я.-М.А., Кубицкая А.О. Иммуномодулирующая активность мультипотентных стромальных клеток тимуса // Матеріали XIII Української науково-практичної конференції з актуальних питань клінічної і лабораторної імунології, алергології та імунореабілітації (Київ, Україна, 26-27 квітня 2012 р.). *Імунологія та алергологія*. 2012. Дод.1. С.45-46 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез*).
 - 15.Nikolskaya K., Zubov D., Taranukha L., Vasyliiev R., Semenova Y.-M. Immune system regeneration with fetal liver cells stimulated by contact with thymic multipotent stromal cells in irradiated mice // Stem Cells and Clinical Application: poster presentations 7th Annual Congress of the German Society for Stem Cell Research associated with Fraunhofer Life Science Symposium (Leipzig, Germany, 29-30 November 2012). Leipzig, 2012. P. 74. (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез*).
 - 16.Никольская Е.И. Повышение продолжительности жизни летально облученных мышей под влиянием мультипотентных стромальных клеток тимуса // Актуальні проблеми регенеративної медицини: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю (Київ, Україна, 4–5 жовтня 2012 р.). *Журнал Національної Академії медичних наук України*. 2012. Т.18, додаток. С.107-108.
 - 17.Никольский И.С., Никольская В.В., Савинова В.О., Тарануха Л.И., Семенова Я.-М.А., Никольская Е.И., Чех Д.Л. Иммунобиологическая активность трансплантатов гемопоэтических и мультипотентных стромальных клеток тимуса // Актуальные вопросы трансплантации стволовых клеток: материалы I Евразийского конгресса «Трансплантация стволовых клеток» (Минск, Беларуссия, 25–27 сентября 2013 г.). Минск, 2013. С. 109-111 (*Особистий внесок*

здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез).

- 18.Никольская Е.И., Тарануха Л.И., Никольская В.В., Семенова Я-М.А., Никольский И.С. Характеристика активности различных типов мультипотентных клеток в лечении пострadiaционного костно-мозгового синдрома у мышей // Трансплантація – сьогодні, минуле та майбутнє: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю (Київ, Україна, 7 листопада 2014 р.). Київ, 2014. С.32 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження і проведенні експериментів, статистична обробка результатів, написання тез*).
- 19.Нікольська К.І. Потенціювання імунорегенеративної і радіозахисної активності гемопоетичних клітин-попередників контактом з мультипотентними стромальними клітинами тимусу // Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині: матеріали міжнародної науково-практичної конференції (Київ, Україна, 9–10 листопада 2017 р.). *Клітинна та органна трансплантологія*. 2017. Т.5, № 2. С. 254.

Наукові праці, що додатково відображають зміст дисертації:

- 20.Никольский И.С., Никольская В.В., Тарануха Л.И., Галицкая С.Н., Зубов Д.А., Никольская Е.И. Радиозащитное действие мультипотентных стромальных клеток тимуса. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2009. № 2/1 (24). С. 284-285 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, проведення експериментів, статистична обробка результатів, участь в обговоренні та інтерпретації результатів, написання статті*).
- 21.Никольский И.С., Никольская В.В., Зубов Д.А., Тарануха Л.И., Галицкая С.Н., Никольская Е.И. Восстановление иммунной системы облученных животных сингенными клетками эмбриональной печени, стимулированными контактом с мультипотентными стромальными клетками тимуса. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2010. № 2/1 (29). С. 61-62 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, проведення експериментів, статистична обробка результатів, участь в обговоренні та інтерпретації результатів, написання статті*).
- 22.Никольская Е.И., Тарануха Л.И., Никольская В.В., Галицкая С.Н., Никольский И.С. Сравнительная характеристика активности различных типов гемопоэтических и мультипотентных стромальных клеток в купировании костно-мозгового синдрома у летально облученных мышей. *Российский иммунологический журнал*. 2014. Т. 8 (17), № 3. С. 354-356 (*Особистий внесок здобувача: участь у формулюванні задач дослідження, проведення експериментів, статистична обробка результатів, участь в обговоренні та інтерпретації результатів, написання статті*).
- 23.Никольская Е.И. Клеточная композиция костномозговых ниш гемопоэтических стволовых клеток (обзор литературы). *Журнал Національної Академії медичних наук України*. 2015. Т. 21, № 3-4. С. 272-286.

Патенти:

- 24.Нікольський І.С., Нікольська В.В., Зубов Д.О., Тарануха Л.І., Галицька С.М.,

Нікольська К.І., Федорчук О.Г. Спосіб підвищення радіорезистентності організму // Пат. 49204 Україна, МПК А61К 35/26; Заявлено 06.10.2009; Дата публ. 26.04.2010, Бюл. № 8 (*Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень та їх аналізі, написання тексту патенту, патентний пошук*).

25. Нікольський І.С., Нікольська В.В., Зубов Д.О., Нікольська К.І., Савінова В.О., Малишева О.О., Спосіб одержання фібробласто-лімфоцитарних розеток (ФЛР), як модельного аналогу тимічної ніши *ex vivo* // Пат. 80076 Україна, МПК С12N 5/00; Заявлено 04.12.2012; Дата публ. 13.05.2013, Бюл. № 9 (*Особистий внесок здобувача: участь у проведенні досліджень та їх аналізі, написання тексту патенту, патентний пошук*).

АНОТАЦІЯ

Нікольська К.І. Стимуляція регенерації імунної системи опромінених мишей трансплантацією гемопоетичних стовбурових клітин і прогеніторів, преінкубованих з мультипотентними стромальними клітинами тимуса. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.08 – Імунологія та алергологія (Медичні науки). – Державна установа «Інститут генетичної та регенеративної медицини Національної академії медичних наук України», Київ; Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України. – Харків, 2020.

Дисертація присвячена вивченню значення контактної взаємодії МСК і ГСК у стимуляції імунологічної, регенеративної і радіозахисної активності трансплантованих клітин. Досліджена відповідна активність накопичених в клітинній культурі МСК тимуса.

Експерименти проведені на 519 мишах лінії СВА. Вперше встановлено, що МСК тимуса та гемопоетичні клітини мають мембранну спорідненість, яка забезпечує можливість міжклітинної контактної взаємодії *in vitro*, що проявляється формуванням фібробласто-лімфоцитарних розеток (ФЛР). Вперше показано, що трансплантовані летально опроміненим мишам преінкубовані з МСК тимуса ККМ і КФП, а також МСК тимуса більш суттєво, ніж нормальні клітини, стимулювали регенеративну активність імунної системи, що проявлялося підвищенням виживаності опромінених тварин і значним відновленням природного і адаптивного імунітету.

Ключові слова: гемопоетичні стовбурові клітини, імунна система, імунологічна активність, міжклітинна контактна взаємодія, мультипотентні стромальні клітини, променевий імунодефіцит, регенерація.

АННОТАЦИЯ

Никольская Е.И. Стимуляция регенерации иммунной системы облученных мышей трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток и прогениторов, преинкубированных с мультипотентными стромальными клетками тимуса. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.08 – Иммунология и аллергология (Медицинские науки). – Государственное учреждение «Институт генетической и регенеративной медицины Национальной академии медицинских наук Украины», Киев; Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина Министерства образования и науки Украины. - Харьков, 2020.

Диссертация посвящена изучению значения контактного взаимодействия МСК и ГСК в стимуляции иммунологической, регенеративной и радиозащитной активности трансплантированных клеток. Исследована соответствующая активность накопленных в клеточной культуре МСК тимуса.

Эксперименты проведены на 519 мышах линии СВА. Впервые установлено, что МСК тимуса и гемопоэтические клетки имеют мембранное сродство, которое обеспечивает возможность межклеточного контактного взаимодействия *in vitro*, что проявляется формированием фибробласто-лимфоцитарных розеток (ФЛР). Впервые показано, что трансплантированные летально облученным мышам преинкубированные с МСК тимуса ККМ и КФП, а также МСК тимуса более существенно, чем нормальные клетки, стимулировали регенеративную активность иммунной системы, что проявлялось повышением выживаемости облученных животных и значительным восстановлением природного и адаптивного иммунитета. **Ключевые слова:** гемопоэтические стволовые клетки, иммунная система, иммунологическая активность, лучевой иммунодефицит, межклеточное контактное взаимодействие, мультипотентные стромальные клетки, регенерация.

ABSTRACT

Nikolska K.I. Stimulation of the immune system regeneration in irradiated mice through transplantation of hematopoietic stem cells and progenitors preincubated with multipotent stromal cells of thymus. – Qualifying scientific work as a manuscript.

Thesis for a Candidate Degree in Medicine: Specialty 14.03.08 – Immunology and allergology (Medical Sciences) – State Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine; V.N. Karazin Kharkiv National University, the Ministry of Education and Science of Ukraine. – Kharkiv, 2020.

The thesis is devoted to the study of the immunobiological, regenerative and radioprotective activity of hematopoietic stem cells (HSCs) and progenitors preincubated with thymic multipotent stromal cells (MSCs) and transplanted to the lethally irradiated mice. The corresponding activity of cultured thymic MSCs was also investigated.

The experiments were performed on 519 of CBA mice by means of adapted techniques for obtaining of cryopreserved thymus MSCs, bone marrow cells (BMCs) and fetal liver cells (FLCs). Some of their cultural and functional properties have been studied, and the ability of the thymus MSCs to be linearly differentiated in osteo- and adipogenic directions as well.

It was first shown:

- thymic MSCs and hematopoietic cells have a membrane affinity providing the intercellular contact interaction *in vitro* which is manifested by the formation of

"rosettes" with centrally located MSCs and several attached hematopoietic cells. Thymocytes have the highest affinity for thymus MSC and significantly smaller one for lymph node cells and FLC which reflects the presence of the highest membrane affinity in the immature T-cells for thymus MSCs;

- MSCs transplanted to lethally irradiated mice significantly stimulated the regenerative activity of the immune system which was manifested by the animal survival increase and significant increase in the absolute and relative thymus weight, elevation of thymocytes quantity and thymus cellularity. In such mice a bone marrow cellularity also increased significantly, and the bone marrow stromal cells ability to form the fibroblast cell colonies was restored, of γ -interferons production and significant increase of immunological activity: hemolysins and hemagglutinins content significantly increased, as well as the leukocytes and neutrophils quantity in peripheral blood after thymic MSCs transplantation in the irradiated and immunized mice, this overall can be considered as a positive effect on the immune system activity and anti-infection protection in radiation bone marrow syndrome.

Preincubated with thymic MSCs BMCs and FLCs, transplanted to lethally irradiated mice significantly stimulated the regenerative activity of the immune system then normal cells did. This was manifested by an increase in the survival rate of irradiated animals and a significant restoration of thymic parameters. In these mice, bone marrow cellularity also increased significantly, and the ability of bone marrow stromal cells to form fibroblast colonies was restored. This indicates the effective regenerative effect of cell preparations. It was first found that under the influence of transplantation BMCs and FLCs, preincubated with thymic MSCs, the production of α/β - and γ -interferons, natural cytotoxicity, delayed hypersensitivity reaction, lymphocyte blast transformation reaction and the ability to antibody formation significantly increased.

Key words: hematopoietic stem cells, immune system, immunological activity, intercellular contact interaction, multipotent stromal cells, radiation immunodeficiency, regeneration.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АУК	– антитілоутворюючі клітини
ГСК	– гемопоетичні стовбурові клітин
ГСТ	– гіперчутливість сповільненого типу
ДР-ГСК	– довгочасно репопулюючі гемопоетичні стовбурові клітини
ККМ	– клітини кісткового мозку
іККМ	– клітини кісткового мозку, преінкубовані з мультипотентними стромальними клітинами (індуковані ККМ)
Кон А	– конконаваліна А
КР-ГСК	– короткочасно репопулюючі гемопоетичні стовбурові клітини
КС	– кондиційне середовище
КУО-Ф	– колонієутворююча одиниця фібробластів
КФП	– клітини фетальної печінки
іКФП	– клітини фетальної печінки, преінкубовані з мультипотентними стромальними клітинами (індуковані КФП)

МСК	– мультипотентні стромальні клітини
МТТ	– 3- (4,5-діметилтуазол-2-іл) -2,5 бромдіфеніл тетразол
РБТЛ	– реакція бласттрансформації лімфоцитів
СТЖ	– середня тривалість життя
ФЛР	– фібробласто-лімфоцитарні розетки
ФНПа	–фактор некрозу пухлин α